

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2000-342264

(P2000-342264A)

(43)公開日 平成12年12月12日 (2000.12.12)

(51)Int.Cl.⁷
C 12 N 15/09
C 12 M 1/00
C 12 Q 1/68
G 01 N 33/483
33/50

識別記号
Z NA

F I
C 12 N 15/00
C 12 M 1/00
C 12 Q 1/68
G 01 N 33/483
33/50

テ-マコド^{*}(参考)
Z NAA 2 G 0 4 5
A 4 B 0 2 4
A 4 B 0 2 9
E 4 B 0 6 3
P

審査請求 未請求 請求項の数15 O L (全 17 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平11-154655

(22)出願日 平成11年6月2日(1999.6.2)

(71)出願人 000005108

株式会社日立製作所

東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地

(72)発明者 梶山 智晴

東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目280番地

株式会社日立製作所中央研究所内

(72)発明者 宮原 裕二

東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目280番地

株式会社日立製作所中央研究所内

(74)代理人 100075096

弁理士 作田 康夫

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ポリヌクレオチド検出チップ及びポリヌクレオチド検査装置

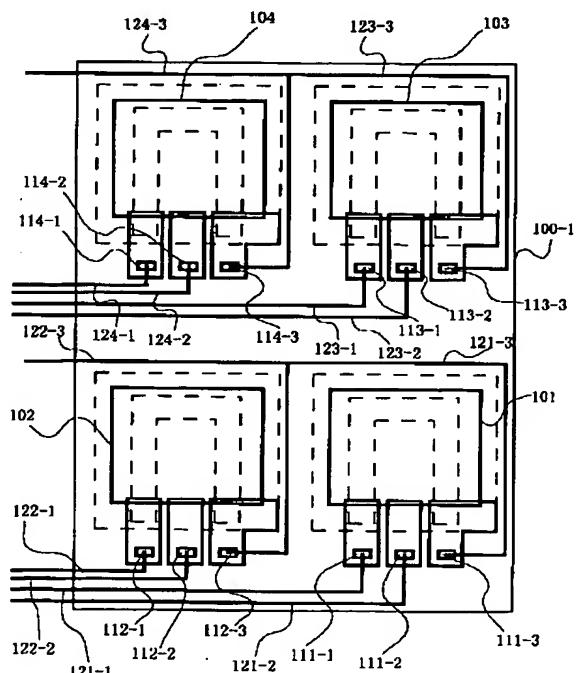
(57)【要約】

【課題】 プローブ毎の相補鎖結合形成を最適温度で行なうポリヌクレオチド検出チップを提供する。

【解決手段】 ポリヌクレオチド検出チップ100-1は、異なるオリゴヌクレオチドプローブが種類毎に固定される複数の区画101~104と、各区画に形成される加熱回路と、各区画に形成される温度検出回路とを有し、各区画の加熱回路、及び温度検出回路が、区画毎に独立して動作するように形成される。

【効果】 各プローブの相補鎖結合のTm値の温度で、相補鎖結合形成するのでTm差による相補鎖結合の生成量及びミスマッチ確率の差異が殆ど生じない。

図1



【特許請求の範囲】

【請求項1】異なるオリゴヌクレオチドプローブが種類毎に固定される複数の区画と、前記区画に形成される加熱回路と、前記区画に形成される温度検出回路とを有することを特徴とするポリヌクレオチド検出チップ。

【請求項2】請求項1に記載のポリヌクレオチド検出チップに於いて、前記各区画の前記加熱回路、及び前記温度検出回路が、前記区画毎に独立して動作するように形成されることを特徴とするポリヌクレオチド検出チップ。

【請求項3】請求項1に記載のポリヌクレオチド検出チップに於いて、前記複数の区画が第1方向、及び第2方向に2次元に形成され、前記各区画の前記加熱回路、及び前記温度検出回路が、前記第1方向に形成された前記区画の複数毎に独立して動作するように形成されることを特徴とするポリヌクレオチド検出チップ。

【請求項4】請求項1に記載のポリヌクレオチド検出チップに於いて、前記複数の区画はシリコン基板に形成され、前記各区画の面にシリコン酸化膜が形成されることを特徴とするポリヌクレオチド検出チップ。

【請求項5】請求項1に記載のポリヌクレオチド検出に於いて、前記複数の区画はシリコン基板に形成され、前記各区画の面にシリコン酸化膜が形成され、前記加熱回路が前記シリコン基板と異なる型のシリコン又はポリシリコンにより形成されることを特徴とするポリヌクレオチド検出チップ。

【請求項6】請求項1に記載のポリヌクレオチドチップに於いて、前記複数の区画はシリコン基板に形成され、前記各区画の面にシリコン酸化膜が形成され、前記温度検出回路がpn接合素子により形成されることを特徴とするポリヌクレオチド検出チップ。

【請求項7】請求項1に記載のポリヌクレオチドチップに於いて、前記複数の区画が第1方向、及び第2方向に2次元に形成され、前記異なるオリゴヌクレオチドプローブに相補的に結合するポリヌクレオチドの相補鎖結合の熱安定性の高いものから、前記第1方向の前記区画、及び前記第2方向の前記区画に、一方向に向けて順次、前記異なるオリゴヌクレオチドプローブが固定されることを特徴とするポリヌクレオチド検出チップ。

【請求項8】請求項1に記載のポリヌクレオチドチップに於いて、前記複数の区画が第1方向、及び第2方向に2次元に形成され、前記異なるオリゴヌクレオチドプローブに相補的に結合するポリヌクレオチドの相補鎖結合の熱安定性の高いものから、前記2次元に形成される前記複数の区画の中心部の前記区画から周辺の前記区画に向かって、順次、前記異なるオリゴヌクレオチドプローブが固定されることを特徴とするポリヌクレオチド検出チップ。

【請求項9】請求項1に記載のポリヌクレオチドチップに於いて、前記複数の区画が第1方向、及び第2方向に

2次元に形成され、前記異なるオリゴヌクレオチドプローブに相補的に結合するポリヌクレオチドの相補鎖結合の融解温度の高いものから、前記第1方向の前記区画、及び前記第2方向の前記区画に、一方向に向けて順次、前記異なるオリゴヌクレオチドプローブが固定されることを特徴とするポリヌクレオチド検出チップ。

【請求項10】請求項1に記載のポリヌクレオチドチップに於いて、前記複数の区画が第1方向、及び第2方向に2次元に形成され、前記異なるオリゴヌクレオチドプローブに相補的に結合するポリヌクレオチドの相補鎖結合の融解温度の高いものから、前記2次元に形成される前記複数の区画の中心部の前記区画から周辺の前記区画に向かって、順次、前記異なるオリゴヌクレオチドプローブが固定されることを特徴とするポリヌクレオチド検出チップ。

【請求項11】異なるオリゴヌクレオチドプローブが種類毎に固定される複数の区画と、前記区画に形成される加熱回路と、前記区画に形成される温度検出回路とを有し、前記複数の区画が複数の行、及び複数の列をなすように2次元に形成され、前記異なるオリゴヌクレオチドプローブが前記複数の行の各行の前記区画に固定され、前記複数の行の各行の前記区画の温度を異なる温度に設定することを特徴とするポリヌクレオチド検出チップ。

【請求項12】異なるオリゴヌクレオチドプローブが種類毎に固定される複数の区画と、前記区画に形成される加熱回路と、前記区画に形成される温度検出回路とを有し、温度の制御を行なう前記区画を選択する選択回路と、選択された前記区画の前記温度検出回路の出力信号に基づいて、前記選択された前記区画の前記加熱回路に対する入力を制御する制御回路とを有することを特徴とするポリヌクレオチド検査装置。

【請求項13】請求項12に記載のポリヌクレオチド検査装置に於いて、前記各区画の前記加熱回路、及び前記温度検出回路が、前記区画毎に独立して動作するように形成され、前記選択回路は1つの前記区画を選択することを特徴とするポリヌクレオチド検査装置。

【請求項14】請求項12に記載のポリヌクレオチド検査装置に於いて、前記複数の区画が第1方向、及び第2方向に2次元に形成され、前記各区画の前記加熱回路、及び前記温度検出回路が、前記第1方向に形成された前記区画の複数毎に独立して動作するように形成され、前記選択回路は、前記第1方向に形成された前記区画の複数を同時に選択することを特徴とするポリヌクレオチド検査装置。

【請求項15】請求項12に記載のポリヌクレオチド検査装置に於いて、前記各区画の前記加熱回路、及び前記温度検出回路が、前記区画毎に独立して動作するように形成され、前記選択回路はTFT回路を含み1つの前記区画を選択することを特徴とするポリヌクレオチド検査装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、DNA、mRNA等を検出して検査を行なうポリヌクレオチド検出チップ及びこれを用いる検査装置に関する。

【0002】

【従来の技術】核酸の塩基配列を測定する従来技術として、予め設計した塩基配列の1本鎖オリゴヌクレオチドプローブを塩基配列の種類毎に領域を分けて固定したポリヌクレオチド検出チップを用い、測定対象である1本鎖ポリヌクレオチドとオリゴヌクレオチドプローブの相補鎖結合（ハイブリダイゼーション）の有無を検出するポリヌクレオチド検出チップが知られている。ポリヌクレオチド検出チップの例として、関心のある特定の変異配列を配置した診断用のポリヌクレオチド検出チップ（Science Vol. 270, 467-470 (1995)）や、測定対象に存在し得る全ての塩基配列に相補鎖結合するオリゴヌクレオチドプローブを準備し、測定対象の塩基配列決定を行なうSBH (sequencing by hybridization) 法が知られている（J. DNA Sequencing and Mapping, Vol. 1, 375-388 (1991)）。

【0003】シリコンウェハに複数の小さな孔（チャンバ）を形成し、微量の反応液を効率良く扱えるようにした生化学反応装置が知られている（特開平5-317030号公報）。この生化学反応装置では、各チャンバ毎にペルティエ素子により形成されるヒータ、及び冷却器を設け、ヒータ、及び冷却器に直接反応液を接触させることにより、反応液の温度制御を行なわせるようにしている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】オリゴヌクレオチドプローブ（以下、単に、プローブという）と1本鎖ポリヌクレオチドの相補鎖結合の熱安定性は、塩基配列毎に異なる。この理由は、アデニン（A）とチミン（T）の結合、又はアデニン（A）とウラシル（U）の結合が、1塩基あたり2カ所の水素結合であるのに対し、グアシン（G）とシトシン（C）の結合は1塩基あたり3カ所の水素結合であることにある。その結果、結合力に差異が生じ、A-T結合又はA-U結合より、G-C結合の方が強いため、熱安定性が高い。従って、同じ塩基長で熱安定性を比較する場合、A-T又はA-U結合のみが存在する2重結合の熱安定性は最も低く、G-C結合のみが存在する2重結合の熱安定性は最も高い。相補鎖結合の熱安定性は、一般的には結合と、結合の解離が50%づつ生じる温度（融解温度）（Tm）で示される。

【0005】図16は、8塩基、25塩基に於ける%GC法により求めたTm値の計算値を示す図である。図16の欄（a）は、8塩基長に於けるTmの最大値（全て

がG-C結合の場合）を、図16の欄（b）は、8塩基長に於けるTmの最小値（全てがA-T結合の場合）を、図16の欄（c）は、25塩基長に於けるTmの最大値（全てがG-C結合の場合）を、図16の欄（d）は、25塩基長に於けるTmの最小値（全てがA-T結合の場合）をそれぞれ示す。このように、8塩基長でのTmは、15.2°Cから56.2°Cまで変化し、25塩基長でのTmは、57.7°Cから98.7°Cまで変化する。

【0006】このように、プローブのハイブリダイゼーションのTm値が大きく変化する場合には、各プローブのハイブリダイゼーションのTm値の温度で行なう必要がある。Tmより高温の条件では、1本鎖ポリヌクレオチドはプローブと結合しにくく、有効な結果が得られない。一方、Tmより低温の条件では、ミスマッチ結合によるバックグラウンドノイズが増加し、測定分解能の劣化を生じる。そのため、ポリヌクレオチド検出チップ（以下、単に、「検出チップ」という）上に複数種類のプローブを固定し、検査対象の1本鎖ポリヌクレオチド試料とハイブリダイゼーションを、ポリヌクレオチド検出チップ上の温度が一様の状態で行なうと、プローブ毎の熱安定性の差異により、プローブの相補鎖結合の生成量の差異、及びミスマッチ確率の差異が生じる問題がある。

【0007】従来の検出チップでは、検出チップ上の全てのプローブについてハイブリダイゼーションを行なう温度は一様に設定し、溶媒の塩濃度の調整や検出チップに固定するプローブ密度やプローブ塩基長を種類毎に変化させる手法により、プローブ毎の熱安定性の差異によるプローブの相補鎖結合の生成量の差異、及びミスマッチ確率の差異を解消する試みがなされている。しかし、上記従来技術では、Tmの差異による影響の十分な解消には至っていない。

【0008】本発明の目的は、Tmの異なる複数種類のプローブを利用す際に、Tmの差によるプローブの相補鎖結合の生成量の差異、及びミスマッチ確率の差異が殆ど生じないポリヌクレオチド検出チップ及びこれを用いるポリヌクレオチド検出装置を提供することにある。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明の検出チップでは、基板としてp-Siを用い、検出チップの各プローブが固定される区画の面の下層に、n形拡散層で形成するヒーター及びp-n接合で温度検出部を形成し、p-n接合の電流電圧特性よりプローブが固定される区画の温度を測定し、この温度の測定結果に応じて、ヒーターに流す電力量を調節して、プローブが固定される区画を加热して、各プローブのハイブリダイゼーションのTm値に各プローブが固定される区画の温度を設定制御する。この結果、各種プローブのハイブリダイゼーションを、Tmの違いに従って異なる温度で行なうことができ、Tm

の差異により、プローブの相補鎖結合の生成量の差異、及びミスマッチ確率の差異が殆ど生じない。

【0010】本発明のポリヌクレオチド検出チップは、異なるオリゴヌクレオチドプローブが種類毎に固定される複数の区画と、前記区画に形成される加熱回路と、前記区画に形成される温度検出回路とを有し、(1)前記各区画の前記加熱回路、及び前記温度検出回路が、前記区画毎に独立して動作するように形成されること、

(2)前記複数の区画が第1方向、及び第2方向に2次元に形成され、前記各区画の前記加熱回路、及び前記温度検出回路が、前記第1方向に形成された前記区画の複数毎に独立して動作するように形成されること、(3)前記複数の区画はシリコン基板に形成され、前記各区画の面にシリコン酸化膜が形成されること、(4)前記複数の区画はシリコン基板に形成され、前記各区画の面にシリコン酸化膜が形成され、前記加熱回路が前記シリコン基板と異なる型のシリコン又はポリシリコンにより形成されること、(5)前記複数の区画はシリコン基板に形成され、前記各区画の面にシリコン酸化膜が形成され、前記温度検出回路がp-n接合素子により形成されること、(6)前記複数の区画が第1方向、及び第2方向に2次元に形成され、前記異なるオリゴヌクレオチドプローブに相補的に結合するポリヌクレオチドの相補鎖結合の熱安定性の高いものから、前記第1方向の前記区画、及び前記第2方向の前記区画に、一方向に向けて順次、前記異なるオリゴヌクレオチドプローブが固定されること、(7)前記複数の区画が第1方向、及び第2方向に2次元に形成され、前記異なるオリゴヌクレオチドプローブに相補的に結合するポリヌクレオチドの相補鎖結合の熱安定性の高いものから、前記2次元に形成される前記複数の区画の中心部の前記区画から周辺の前記区画に向けて、順次、前記異なるオリゴヌクレオチドプローブが固定されること、(8)前記複数の区画が第1方向、及び第2方向に2次元に形成され、前記異なるオリゴヌクレオチドプローブに相補的に結合するポリヌクレオチドの相補鎖結合の融解温度の高いものから、前記第1方向の前記区画、及び前記第2方向の前記区画に、一方向に向けて順次、前記異なるオリゴヌクレオチドプローブが固定されること、(9)前記複数の区画が第1方向、及び第2方向に2次元に形成され、前記異なるオリゴヌクレオチドの相補鎖結合の融解温度の高いものから、前記2次元に形成される前記複数の区画の中心部の前記区画から周辺の前記区画に向けて、順次、前記異なるオリゴヌクレオチドプローブが固定されること、(10)前記プローブが固定される前記区画の面以外の面に撥水処理がなされること等に特徴がある。

【0011】また、本発明のポリヌクレオチド検出チップは、異なるオリゴヌクレオチドプローブが種類毎に固定される複数の区画と、前記区画に形成される加熱回路

と、前記区画に形成される温度検出回路とを有し、前記複数の区画が複数の行、及び複数の列をなすように2次元に形成され、前記異なるオリゴヌクレオチドプローブが前記複数の行の各行の前記区画に固定され、前記複数の行の各行の前記区画の温度を異なる温度に設定することを特徴とする。

【0012】本発明のポリヌクレオチド検査装置は、異なるオリゴヌクレオチドプローブが種類毎に固定される複数の区画と、前記区画に形成される加熱回路と、前記区画に形成される温度検出回路とを有し、温度の制御を行なう前記区画を選択する選択回路と、選択された前記区画の前記温度検出回路の出力信号に基づいて、前記選択された前記区画の前記加熱回路に対する入力を制御する制御回路とを有し、(1)前記各区画の前記加熱回路、及び前記温度検出回路が、前記区画毎に独立して動作するように形成され、前記選択回路は1つの前記区画を選択すること、(2)前記複数の区画が第1方向、及び第2方向に2次元に形成され、前記各区画の前記加熱回路、及び前記温度検出回路が、前記第1方向に形成された前記区画の複数毎に独立して動作するように形成され、前記選択回路は、前記第1方向に形成された前記区画の複数を同時に選択すること、(3)前記選択回路はTFT回路を含むこと、(4)前記プローブが固定される前記区画の面以外の面に撥水処理がなされること等に特徴がある。

【0013】なお、シリコンウエハに複数の小さなチャンバを形成する特開平5-317030号公報に記載の生化学反応装置では、同時に多数の生化学的試料を扱い、必要に応じて個々の試料について独立に反応条件を設定する技術思想を開示するが、本願発明の技術思想は開示されていない。即ち、特開平5-317030号公報には、複数種類のプローブが別々に固定される複数の区画を持つ検出チップの表面に一種類の試料を添加し、各区画に形成される温度検出部により各区画の温度を測定しこの温度の測定結果に応じて各区画を加熱して、各プローブのハイブリダイゼーションのTm値に各区画の温度を設定制御することの記載は何もない。

【0014】

【発明の実施の形態】以下の各実施例では説明を簡単とするために少數の区画を持つ検出チップを例により説明するが、実際のポリヌクレオチド検査装置に使用される検出チップでは、例えば、区画の数は100×100、区画の大きさは50μm×50μm、検出チップの大きさは10mm×10mm、検出チップの厚さは0.5mm～1mm程度である。

【0015】(実施例1)図1は、以下で説明する本発明の実施例1の検出チップ100-1の構成を示す平面図である。シリコン酸化膜が形成された表面に、複数のプローブが固定される区画101、102、103、104が設けられている。各区画には、区画毎にそれぞれ

一種類づつのプローブが固定されている。プローブが固定される区画の面の外部の領域には、1つのプローブが固定される区画に対して、3個の端子111-1～111-3、112-1～112-3、113-1～113-3、114-1～114-3が設けられており、各端子は配線121-1～121-3、122-1～122-3、123-1～123-3、124-1～124-3を介して、後述の電圧制御回路へ接続している。但し、配線121-3と122-3、及び配線123-3と124-3は、それぞれ途中で接続している。

【0016】図2は、実施例1の検出チップ100-1の部分拡大平面図である。図2は、区画101の拡大図である。作用電極端子と定義する端子111-1は、ポリシリコン層141-1により酸化膜の窓131-1を介して後述のシリコン酸化膜の内部に電気的に接続している。同様に、基準電極端子と定義する端子111-3は、ポリシリコン層141-3により酸化膜の窓131-3及び窓131-4を介して後述のシリコン酸化膜の内部に電気的に接続している。同様に、温度検出端子と定義する端子111-2は、ポリシリコン層141-2により酸化膜の窓131-2を介して後述のシリコン酸化膜の内部に電気的に接続している。なお、基準電極端子111-3は、基準電位(アース)とするため、他の区画の基準電極端子と共に接続することが可能である。シリコン酸化膜の内部には、以下の回路が形成されている。

【0017】図3は、本発明の実施例1の検出チップ100-1の内部回路を説明する部分拡大平面図であり、内部の説明のため、シリコン酸化膜を取り除いた図である。破線101は、上述のプローブが固定される区画に相当する。シリコン酸化膜層の内部には、p-Siの層32を有し、n形拡散層の導電線ヒーター31、n形拡散層のpn接合部33が形成されている。p-Si層の周囲は、シリコン樹脂等の断熱性材料で形成している。導電性ヒーター31の両端は、ポリシリコン層を介して作用電極端子と基準電極端子に電気的に接続している。また、pn接合部33は、ポリシリコン層を介して温度検出端子に電気的に接続している。

【0018】図4は、図2及び図3のA-A'に於ける断面図であり、端子部の断面を示す。p-Siの層32、n形拡散層の導電線ヒーター31、シリコン樹脂等の断熱性材料42、ポリシリコン層141-1、作用電極端子111-1、窓131-1、シリコン酸化膜41及び43で構成されている。本発明の実施例の検出チップの作成方法の概要は以下の通りである。先ず、p-Si基板32に、n形拡散層の導電線ヒーター31、及びn形拡散層のpn接合部33を形成した後に、シリコン酸化膜41を形成する。次に、さきに形成したシリコン酸化膜41の反対側の面からp-Si基板32を、所定の形状でエッチングして、シリコン樹脂等の断熱性材料

42が充填する空間を形成する。

【0019】図5は、図2及び図3のB-B'に於ける断面図であり、プローブが固定される区画の中央部の断面を示す。p-Siの層32、n形拡散層の導電線ヒーター31、シリコン樹脂等の断熱性材料42、シリコン酸化膜41で構成されている。図6は、検出チップの各端子と電圧制御回路の接続構成を説明する図である。電圧制御回路60は、1つのプローブが固定される区画毎に以下の電極を有する。電極64-3は、基準電位

(アース)電極であり、基準電極端子111-3に接続する。電極64-2は、定電圧電源62に接続し電流検出器63を有する電極であり、温度検出端子111-2に接続する。電極64-1は、可変電圧電源61に接続した電極であり、作用電極端子111-1に接続する。

【0020】なお、電極64-3は、基準電位(アース)であるため、検出チップ上の全ての区画について共通に利用できる。電流検出器63は、検出チップ上のpn接合部に定電圧電源を接続した場合にpn接合部の電流が検出できる。この接続は順バイアス方向であり、流れれる電流はpn接合部の温度により指數関数的に変化する。Si層は、熱伝導率が良く、pn接合部の温度とp-Si層の温度はほぼ等しいため、pn接合部の電流値によりプローブが固定される区画の温度が検出できる。

【0021】可変電圧電源61は、作用電極端子と基準電極端子の間の印加電圧を調節する。作用電極端子と基準電極端子の間に作用電極端子側を正極となるように電圧を印加すると、検出チップのn形拡散層の導電線ヒーターに電流が流れ、ジュール熱が発生する。ジュール熱の発熱量は、印加電圧を制御する方法、又は電圧印加時間で制御する方法により調節できる。

【0022】なお、p-Si層は基準電極端子111-3により基準電位(アース)となっており、作用電極端子側を正極となるように接続すると、n形拡散層の導電線ヒーターとp-Si層は逆バイアスとなり、p-Si層への電流漏洩は生じない。以上説明した構成により、本発明では各プローブが固定される区画の温度を測定し、ジュール熱の加熱により制御することが可能である。

【0023】本発明の検出チップを用いるポリヌクレオチド検出検査装置の使用方法は、以下の通りである。使用者が使用する複数種類の検出チップに関するプローブの配置情報、及び、これら各プローブに対するハイブリダイゼーションを適正に実行する温度の情報は、データベース化されている。使用者は反応槽の中に検出チップをセットする。ポリヌクレオチド検出検査装置は、検出チップの識別情報、例えばバーコード等を認識し、その検出チップに配置されるプローブの位置情報、又は各プローブに対するハイブリダイゼーションを適正に実行する温度の情報をデータベースから得る。

【0024】ポリヌクレオチド試料を反応槽に注入する

と共に、反応槽の全体の温度、及び個々のプローブが固定される面の温度を、各プローブが配置され位置情報、又は各プローブに対するハイブリダイゼーションのTm値の情報に応じて調整し、ハイブリダイゼーションを行なう。または、試料注入の前に温度設定を開始し、温度が安定した状態でポリヌクレオチド試料を反応槽に注入することもできる。

【0025】図7は、試料を注入した検出チップ100-1の状態を示す断面図である。73は検出チップ面に注入した試料溶液、71と72は、それぞれ異なるプローブであり、プローブが固定される区画711、721は、それぞれプローブ71、72のハイブリダイゼーションのTm値の温度に制御されている。シリコン基板の熱伝導率(約16.8W/m/K)は、水溶液の熱伝導率(約0.6W/m/K)と比較して約280倍ほど大きく、プローブが固定される区画の温度を区画毎に設定することが可能である。一定時間のハイブリダイズ過程を終了の後、検出チップを洗浄する洗浄溶液を用いて非結合ポリヌクレオチドを洗浄除去する。

【0026】(実施例2) 図8は、本発明の実施例2の検出チップ100-2を示し、実施例1の検出チップ100-1のプローブが固定される区画の面以外の面に撥水処理を行った検出チップの断面図を示す。実施例2では、プローブが固定される区画80にはプローブが固定されており、プローブが固定される面以外の領域81には、撥水性被膜が塗布されている。実施例2では、プローブが固定される区画の面と撥水性被膜塗布面に於ける水の濡れ性の違いから、試料注入を行なうと図8に示すようにプローブ面上にのみ試料溶液82が存在するようになる。この場合、異なるプローブ面の間の試料溶液の流動がないため断熱性が良く、個々のプローブが固定される区画の温度設定が容易になる。

【0027】(実施例3) 各プローブが固定される区画に於けるジュール熱制御の方法として、TFT回路を利用すること有効である。図9は、本発明の各実施例での検出チップの各区画に於けるジュール熱制御をTFT回路により行なうことを説明する図である。TFT回路が形成された基板150は、検出チップ100-1、100-2の下面に重ねて使用する。端子901、902、903、904は、各区画の作用電極端子111-1、111-2、111-3、111-4にそれぞれ接続する。TFTゲート90-1、90-2、90-3、90-4には、端子901、902、903、904がそれぞれ接続する。91-1、91-2は電圧印加線、92-1、92-2はそれに接続する電圧印加選択スイッチ、93-1、93-2はTFT回路のゲート線である。以上説明した構成により、例えば、作用電極端子111-1は、端子901、TFTゲート90-1、電圧印加線91-1、スイッチ92-1を経由して、電源94に接続する。電圧印加選択スイッチ92-1、92-

2は電源94の内部で、ON、OFFが選択される。

【0028】以下、あるプローブが固定される区画のジュール熱発生量の制御を例として説明する。ここで、そのプローブが固定される区画の作用電極端子は、TFT回路の端子901と接続しているとする。また、その基準電極端子はアースされている。先ず、電源94の内部で端子901の接続している電圧印加選択スイッチ92-1をON(導通)、その他の電圧印加選択スイッチをOFF(絶縁)とする。この状態で、ゲート線選択制御

10回路95の制御により、ある時間tだけ、ゲート線93-1をON電位とすると、TFTゲート90-1が時間tだけON状態となる。その結果、プローブが固定される区画のヒーターには時間tだけ94の電圧Vが接続され、ジュール熱t・V[W]が発生する。ジュール熱の調整はゲートON時間tを変更すれば可能であり、1本の電圧印加線に属する全てのTFT回路を独立に調節できる。以上の制御を、各電圧印加線毎に行ない、検出チップの各プローブが固定される区画に於けるジュール熱発生量を制御できる。実施例3に示す構成は、本発明の各実施例に適用できる。

【0029】(実施例4) 検出チップ上に存在するプローブのうち、いくつかのプローブのハイブリダイゼーションを同じ温度条件で実行できる場合、それらのプローブのプローブが固定される区画を一括して温度制御することもできる。図10は、実施例4を説明する図であり、プローブが固定される複数の区画の温度制御を説明する図である。図10は、12個のプローブが固定される区画を有する検出チップ100-3の例である。1001～1006は同じ温度条件で使用できるとする。この場合、シリコン酸化膜内部の回路は、図10の様に配置する。端子1011は、プローブが固定される区画の作用電極端子である。端子1012は区画の基準電極端子である。実施例4によれば、検出チップ上の端子数を必要最小限に減らすことができる。実施例4に示す構成は、本発明の各実施例に適用できる。

【0030】(実施例5) 本発明を実施する際に、検出チップ上のプローブの配置を、以下の様にすることが有効である。図11は、実施例5を説明する図であり、検出チップ100-1、100-2でのプローブの配置を説明する平面図である。例として、30種類のプローブを有する検出チップ100-4を用いて説明する。30種類のプローブは、ハイブリダイゼーションのTm値の温度が最も高温のプローブから順に、P1、P2、P3、…、P30とする。この場合、プローブの配置を、各プローブのハイブリダイゼーションのTm値の温度の変化の分布がほぼ位置方向に勾配を持つように配置する。

【0031】即ち、最高温度のハイブリダイゼーションのTm値を持つプローブP1と、最低温度のハイブリダイゼーションのTm値を持つプローブP30を両端に配

置させる。この結果、検出チップに注入した試料溶液の温度分布は、最高温度のハイブリダイゼーションのT_m値を持つプローブP1を基点に最低温度のハイブリダイゼーションのT_m値を持つプローブP30の方向へ、緩やかな減少傾向を有する。隣り合う区画の設定温度差が最小となり、温度設定が簡便化される。また、別のプローブの配置として、最高温度のハイブリダイゼーションのT_m値を持つプローブP1をチップの中央に配置し、最低温度のハイブリダイゼーションのT_m値を持つプローブP30を周辺部分に配置する方法でも、同様の効果が得られる。実施例5に示す構成は本発明の各実施例に適用できる。

【0032】(実施例6) 図12は、本発明の実施例6を説明する図であり、検出チップの温度調節用の上蓋を説明する平面図である。実施例6では、実施例5で示した、30種類のプローブを有する検出チップ100-4を用いたハイブリダイゼーションに関して説明する。温度調節用の上蓋1300は、使用する検出チップに於けるプローブの配置に応じて、温度分布を粗調整できる複数の温度調整領域を有している。各温度調整領域の温度の調整は、温度制御回路(図示せず)により行なう。図12に示す例では、3つの温度調整領域1201～1203を有する。図11に示す検出チップ100-4と、この温度調節用の上蓋1300を、試料溶液を注入する空隙を有した状態で、破線で示すP1及び破線で示すP30が、それぞれプローブが固定される区画P1及びP30に一致するように重ねる。

【0033】図13は、図12のC-C'に於ける、検出チップに温度調節用の上蓋を重ねた状態を示す断面図である。この状態で、上蓋と検出チップの空隙1301に試料を注入する。上蓋の温度調整領域は、各温度調整領域に重なるプローブが固定される区画のプローブのハイブリダイゼーションのT_m値の温度の平均に設定する。例えば、温度調整領域1201はプローブP1～プローブP4に重なるため、プローブP1～プローブP4のハイブリダイゼーションのT_m値の温度の平均に設定する。実施例6によれば、上蓋で試料溶液の温度の粗調整が可能であり、検出チップの温度制御の安定性が増加

```
G T C G T T T T
C G T C G T T T
C C G T C G T T
G C C G T C G T
G G C C G T C G
T G G C C G T C
C T G G C C G T
A C T G G C C G
C T C G T T T T
```

検査対象として、配列番号10の塩基配列を持つ蛍光標識された17塩基長のDNA断片を用いる。配列番号10の塩基配列を持つDNA断片と1塩基のみ異なる3種

する効果を有する。実施例6に示す構成は、本発明の各実施例に適用できる。

【0034】(実施例7) 以上の各実施例に於いて、p形をn形とし、電極の正・負を逆とする場合、同様の効果が達成できる。具体的には、n-Si基板を用い、導電線ヒーター及び温度検出部をp形拡散層で形成し、作用電極端子には負電極を接続し、温度検出端子には正電極を接続する。但し、p形拡散層は、n形拡散層より電気伝導率が低いため、ヒーター部にn形を使用する実施例1～実施例7の方が優れている。

【0035】(実施例8) 検査対象とする1種類のオリゴヌクレオチドをオリゴヌクレオチドプローブを使用して検出する場合、検査対象とする1種類のポリヌクレオチドに対し、複数のオリゴヌクレオチドプローブについて、検査対象とするポリヌクレオチドと各種プローブとの結合の熱安定性を求めて、検査対象とするポリヌクレオチドを検出するための最適なプローブの種類と、最適なプローブと検査対象とするポリヌクレオチドとのハイブリダイゼーションを行なう最適温度とを決定する必要がある(例えば、J. DNA Sequencing and Mapping, Vol. 1, 375-388(1991))。

【0036】図14は、実施例8を説明する図であり、検出チップ1400でのプローブの配置を説明する平面図である。図14に示すように、検出チップ1400は99区画を持ち、配列番号1から配列番号9の塩基配列を持つ9種類のオリゴヌクレオチドプローブP'1～P'9が、図14に示すように各区画に固定される。即ち、図14に示す検出チップ1400の99区画の第1行から第11行にプローブP'1～P'9を固定し、各行毎の区画の設定温度を異なる温度にする。図14に示す例では、各行の区画の設定温度はT=0°C～T=50°Cである。なお、図14に示す例では、各行の区画の設定温度が順次上昇するように設定しているが、これに限らず一般に任意の温度の順に各行の区画の設定温度を設定しても良いことは言うまでもない。

【0037】

(配列番号1)

(配列番号2)

(配列番号3)

(配列番号4)

(配列番号5)

(配列番号6)

(配列番号7)

(配列番号8)

(配列番号9)

類の塩基配列を持ち、配列番号11から配列番号13の塩基配列を持つ蛍光標識された17塩基長のDNA断片は、配列番号10の塩基配列を持つDNA断片に対する

多型の例を示す試料である。

TGACCGGCAGCAAAATG
TGACCGGTAGCAAAATG
TGACCGGAAGCAAAATG
TGACCGCCAGCAAAATG

配列番号 10 の塩基配列を持つDNA断片を図14に示す検出チップ1400に注入して、配列番号 10 の塩基配列を持つDNA断片と各区画に固定されたプローブとのハイブリダイゼーションを行なう。各区画では、各区画に設定された温度条件に於ける、各区画に固定されたプローブと配列番号 10 の塩基配列を持つDNA断片との間の結合率を反映した量のDNA断片が捕捉される。各区画に捕捉されたDNA断片の蛍光標識をレーザ照射して発する蛍光を測定することにより、配列番号 10 の塩基配列を持つDNA断片と9種類のプローブP' 1 ~ P' 9の各プローブとの間でのハイブリダイゼーション温度特性を得ることが出来る。

【0039】図15は、DNA断片とプローブとの間でのハイブリダイゼーション温度特性の例を示す図である。図15に於いて、縦軸は、各区画に固定されたプローブと試料であるDNA断片との間の結合率を示し、結合率が100%であることは試料であるDNA断片の全ての断片にプローブが結合した状態を示す、横軸は、各区画に設定された温度を示す。図15に示すハイブリダイゼーション温度特性1501は、配列番号4を持つプローブP' 4と配列番号10の塩基配列を持つDNA断片との間での結合の温度特性を示す。

【0040】また、配列番号10の塩基配列を持つDNA断片に対する多型の例を示す試料である、配列番号1から配列番号13の塩基配列を持つ蛍光標識されたDNA断片の各試料毎に、同様にハイブリダイゼーション温度特性の評価を行なうことにより、1塩基だけミスマッチする場合のDNA断片とプローブとの間での結合の温度特性も得ることが出来る。図15に示すハイブリダイゼーション温度特性1502、1503、1504は、それぞれ、配列番号11から配列番号13の塩基配列を持つDNA断片とプローブP' 4と間での結合の温度特性を示す。

【0041】実施例8で説明した方法では、文献 (J. DNA Sequencing and Mapping, Vol. 1, 375-388 (1991)) に記載されたFig. 2と同等の測定結果を、4回のハイブリダイゼーション測定により得ることが出来る。実施例8の方法では、1種類の試料のDNA断片と複数の種類のプローブとの間でのハイブリダイゼーションを一度に同時の行なうので、PCR增幅等の試料調整に於ける諸条件の差に起因する誤差、ハイブリダイゼーション時間の差に起因する誤差、検出チップの洗浄時間に起因する誤差も生じにくく、ハイブリダイゼーション温度特性の測定誤差が少なく、ハイブリダイゼーション温度特性の評

【0038】

(配列番号10)
(配列番号11)
(配列番号12)
(配列番号13)

価をより正確にできという特徴を有する。配列番号10の塩基配列を持つDNA断片の検出に最適なハイブリダイゼーション温度を実験的に求めることができる。

【0042】例えば、検査対象の試料の中に、配列番号10の塩基配列を持つDNA断片と、配列番号10の塩基配列を持つDNA断片に対する多型の例である、配列番号11から配列番号13の塩基配列を持つDNA断片とが存在することが予め判明しており、配列番号10の塩基配列を持つDNA断片の存在を判定したい場合、配列番号10の塩基配列を持つDNA断片とプローブとの間での結合率と、配列番号11から配列番号13の塩基配列を持つDNA断片とプローブとの間での結合率との比が最も大きいプローブ、及びハイブリダイゼーション温度を選択すれば良い。

【0043】図15に示す例では、区画の設定温度が35°Cの場合に、プローブP' 4と配列番号10の塩基配列を持つDNA断片との間での結合率が約50%であり、プローブP' 4と配列番号11から配列番号13の塩基配列を持つDNA断片との間での結合率が約1.2%未満であり、配列番号10の塩基配列を持つDNA断片とプローブP' 4との間での結合率と、配列番号11から配列番号13の塩基配列を持つDNA断片とプローブP' 4との間での結合率との比が最も大きい。従って、図15に示す例では、プローブP' 4と配列番号10の塩基配列を持つDNA断片との間での最適なハイブリダイゼーション温度は35°Cとなる。

【0044】図15に示す例で説明したような、検出対象とするDNA断片とプローブとの間でのハイブリダイゼーション温度特性を、全てのプローブP' 1 ~ P' 9に関して求め、検出対象のDNA断片の検出に最適なプローブをP' i (iは、1から9の何れか)とする時、検出対象とするDNA断片とプローブP' iとの間での結合率と、検出対象とするDNA断片とプローブP' j (j = 1 ~ 9、但し、j ≠ i)との間での結合率との比が最も大きくなるようにプローブP' iとハイブリダイゼーション温度を求める。以上のようにして、検出対象とするDNA断片と複数のプローブとの間でのハイブリダイゼーション温度特性を測定誤差が少なく求めることができ、検出対象のDNA断片の検出に最適なプローブの種類と、最適なハイブリダイゼーション温度を求めることが出来る。この結果、目的とするDNA断片を最適なハイブリダイゼーション温度の下で行なうことができ、より正確に目的とするDNA断片を検出できる。

【0045】

【発明の効果】本発明の検出チップ、及びポリヌクレオ

チド検出装置によれば、検出チップの各区画に固定された各プローブのハイブリダイゼーションのTm値の温度に、検出チップの各区画の温度を設定制御してハイブリダイゼーションを実行するので、Tmの差によるプロ-

ブの相補鎖結合の生成量の差異、及びミスマッチ確率の差異が殆ど生じない検査が可能となる。

【0046】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> HITACHI, LTD.

<120> Polynucleotide Detection Chips and Polynucleotide Detection Apparatus

<130> H99009821A1

<160> 13

<210> 1

<211> 8

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe hybridizing with DNA fragment.

<400> 1

gtcgttt 8

<210> 2

<211> 8

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe hybridizing with DNA fragment.

<400> 2

cgtcgtt 8

<210> 3

<211> 8

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe hybridizing with DNA fragment.

<400> 3

ccgtcgtt 8

<210> 4

<211> 8

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe hybridizing with DNA fragment.

<400> 4

gccgtcgt 8

<210> 5

<211> 8

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe hybridizing with DNA fragment.

<400> 5

ggccgtcg 8

<210> 6

<211> 8

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe hybridizing with DNA fragment.

<400> 6

tggccgtc 8

<210> 7

<211> 8

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe hybridizing with DNA fragment.

<400> 7

ctggccgt 8

<210> 8

<211> 8

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe hybridizing with DNA fragment.

<400> 8

actggccg 8

<210> 9
<211> 8
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> DNA probe hybridizing with DNA fragment.

<400> 9
ctcgttt 8

<210> 10
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> fluorescently labeled DNA fragment.

<400> 10
tgaccggcagcaaaatg 17

<210> 11
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> fluorescently labeled DNA fragment.

<400> 11
tgaccggtagcaaaatg 17

<210> 12
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> fluorescently labeled DNA fragment.

<400> 12
tgaccggaagcaaaatg 17

<210> 13
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

21

22

<220>
<223> fluorescently labeled DNA fragment.

<400> 13
tgaccgcagcaaaatg 17

配列表フリーテキスト

(1) 配列番号 1 の配列に関する他の関連する情報の記録

DNA断片に相補結合するDNAプローブ

(2) 配列番号 1 の配列に関する他の関連する情報の記録

DNA断片に相補結合するDNAプローブ

(3) 配列番号 1 の配列に関する他の関連する情報の記録

DNA断片に相補結合するDNAプローブ

(4) 配列番号 1 の配列に関する他の関連する情報の記録

DNA断片に相補結合するDNAプローブ

(5) 配列番号 1 の配列に関する他の関連する情報の記録

DNA断片に相補結合するDNAプローブ

(6) 配列番号 1 の配列に関する他の関連する情報の記録

DNA断片に相補結合するDNAプローブ

(7) 配列番号 1 の配列に関する他の関連する情報の記録

DNA断片に相補結合するDNAプローブ

(8) 配列番号 1 の配列に関する他の関連する情報の記録

DNA断片に相補結合するDNAプローブ

(9) 配列番号 1 の配列に関する他の関連する情報の記録

DNA断片に相補結合するDNAプローブ

(10) 配列番号 1 の配列に関する他の関連する情報の記録

蛍光標識されたDNA断片

(11) 配列番号 1 の配列に関する他の関連する情報の記録

蛍光標識されたDNA断片

(12) 配列番号 1 の配列に関する他の関連する情報の記録

蛍光標識されたDNA断片

(13) 配列番号 1 の配列に関する他の関連する情報の記録

蛍光標識されたDNA断片

【図面の簡単な説明】

【図 1 】 本発明の実施例 1 の検出チップの構成を示す平面図。

【図 2 】 本発明の実施例 1 の検出チップの部分拡大平面

図。

【図 3 】 本発明の実施例 1 の検出チップの内部回路を説明する部分拡大平面図。

10 【図 4 】 図 2 及び図 3 の A - A' に於ける断面図。

【図 5 】 図 2 及び図 3 の B - B' に於ける断面図。

【図 6 】 本発明の実施例 1 の検出チップの各端子と圧制御回路の接続構成を説明する図。

【図 7 】 本発明の実施例 1 の検出チップに試料を注入した状態を示す断面図。

【図 8 】 本発明の実施例 2 の検出チップであり、プローブが固定される区画の面以外の面に撥水処理を行った検出チップの断面図。

【図 9 】 本発明の実施例 3 を説明する図であり、各実施例での検出チップの各プローブが固定される区画に於けるジュール熱制御を TFT 回路により行なうことを説明する図。

【図 10 】 本発明の実施例 4 を説明する図であり、プローブが固定される複数の区画の温度制御を説明する図。

【図 11 】 本発明の実施例 5 を説明する図であり、検出チップでのプローブの配置を説明する平面図。

【図 12 】 本発明の実施例 6 を説明する図であり、検出チップの温度調節用の上蓋を説明する平面図。

30 【図 13 】 図 12 の C - C' に於ける、検出チップに温度調節用の上蓋を重ねた状態を示す断面図。

【図 14 】 本発明の実施例 8 を説明する図であり、検出チップでのプローブの配置を説明する平面図。

【図 15 】 本発明の実施例 8 に於いて、DNA断片とプローブとの間でのハイブリダイゼーション温度特性の例を示す図。

【図 16 】 8 塩基、 25 塩基に於ける %GC 法により求めた Tm 値の計算値を示す図。

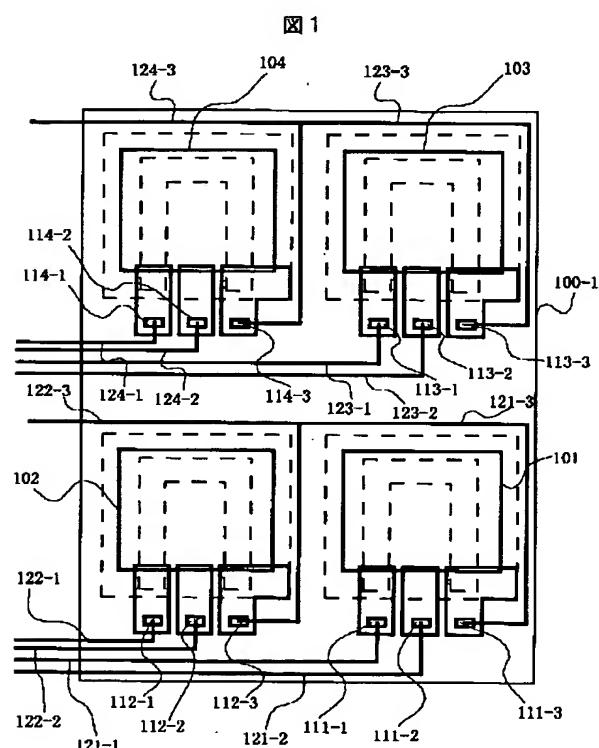
【符号の説明】

31 … n 形拡散層の導電線ヒーター、 32 … p - Si の層、 33 … n 形拡散層の p - n 接合部、 42 … シリコン樹脂等の断熱性材料、 41 、 43 … シリコン酸化膜、 60 … 電圧制御回路、 61 … 可変電圧電源、 62 … 定電圧電源、 63 … 電流検出器、 64-1 、 64-2 、 64-3 … 電極、 71 、 72 … プローブ、 73 、 82 … 試料溶液、 81 … プローブが固定される区画の面以外の領域、 90-1 ~ 90-4 … TFT ゲート、 91-1 、 91-2 電圧印加線 … 、 92-1 、 92-2 電圧印加選択スイッチ、 93-1 、 93-2 TFT 回路のゲート線、 94 … 電源、 95 … スイッチ選択及びゲート線選択スイッチ制御回路、 100-1 、 100-2 、 100-3 、

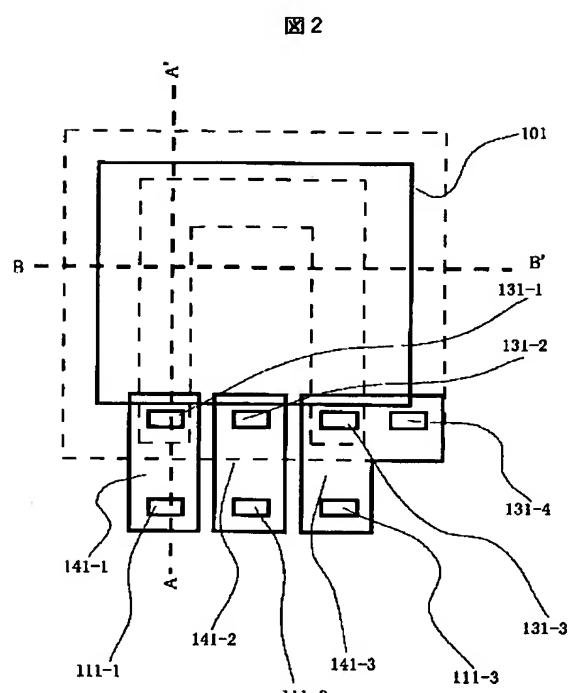
100-4、1400…検出チップ、80、101~104、711、721…プローブが固定される区画、121-1~121-3、122-1~122-3、123-1~123-3、124-1~124-3…配線、111-1、112-1、113-1、114-1…作用電極端子、111-2、112-2、113-2、114-2…温度検出端子端子、111-3、113-2、113-3、114-3…基準電極端子端子、131-1~131-4…酸化膜

の窓、141-1、141-2、141-3…ポリシリコン層、150…TFT回路が形成された基板、901、902、903、904…TFT回路の端子、1001~1006…、1011…端子、1201~1203…温度調整領域、1300…温度調節用の上蓋、1301…上蓋と検出チップの空隙、1501、1502、1503、1504…ハイブリダイゼーション温度特性。

【図1】

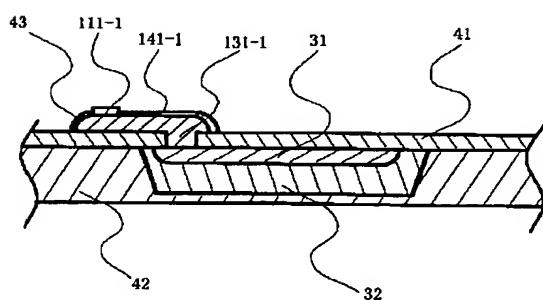


【図2】



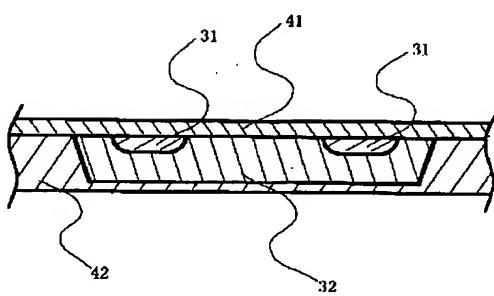
【図4】

図4



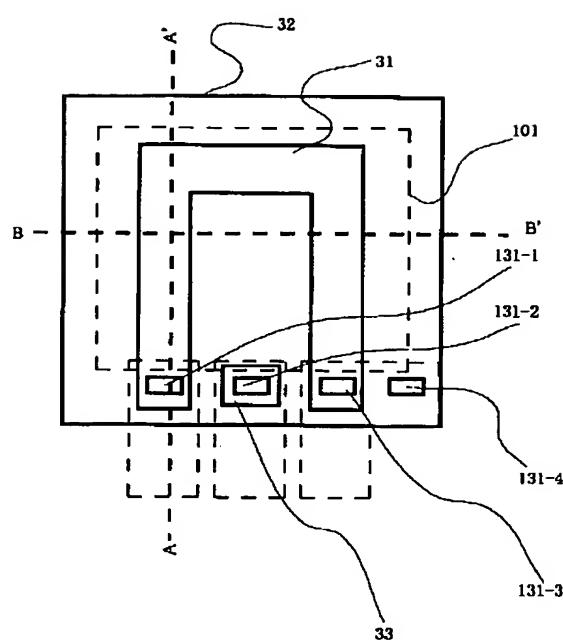
【図5】

図5



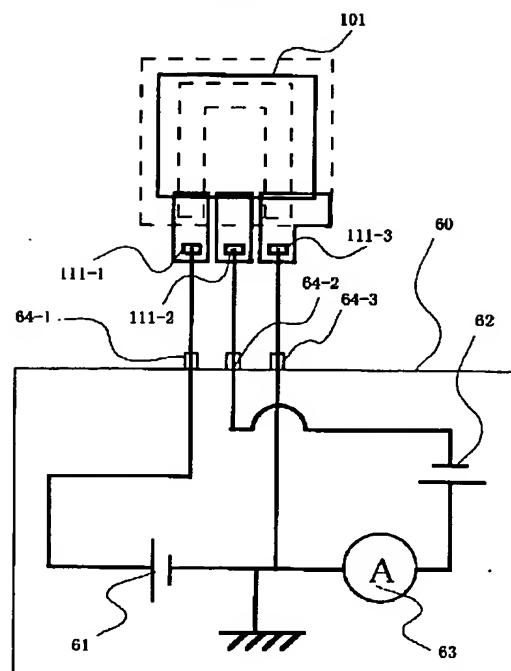
【図 3】

図 3



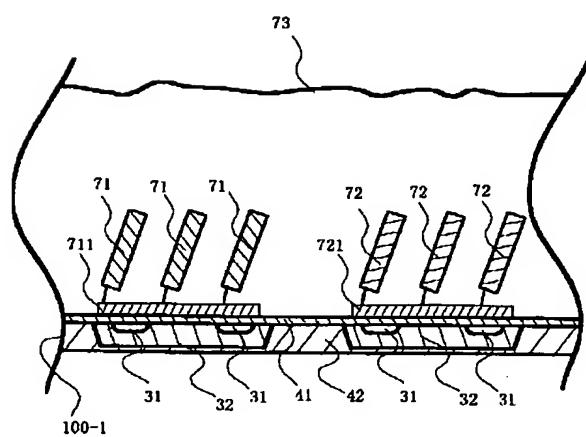
【図 6】

図 6



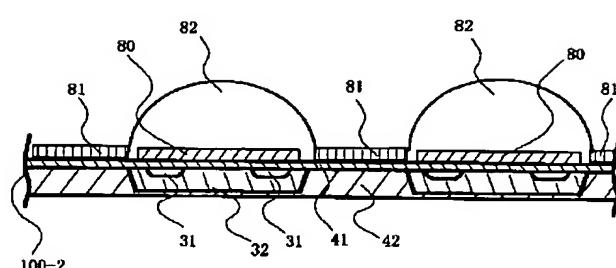
【図 7】

図 7



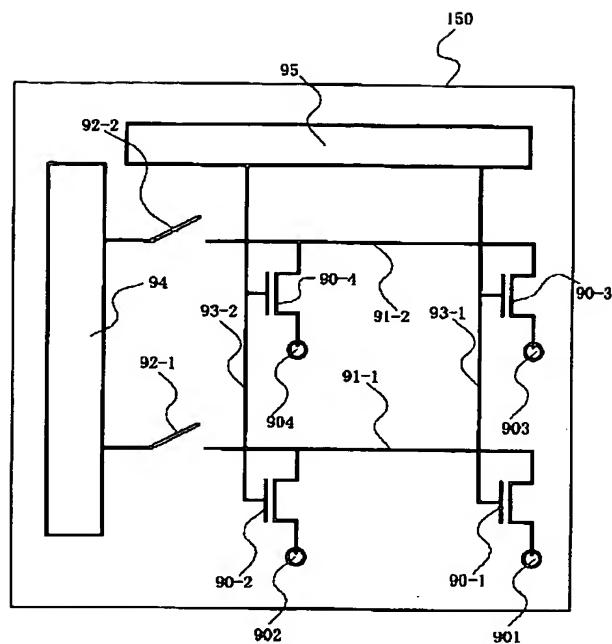
【図 8】

図 8



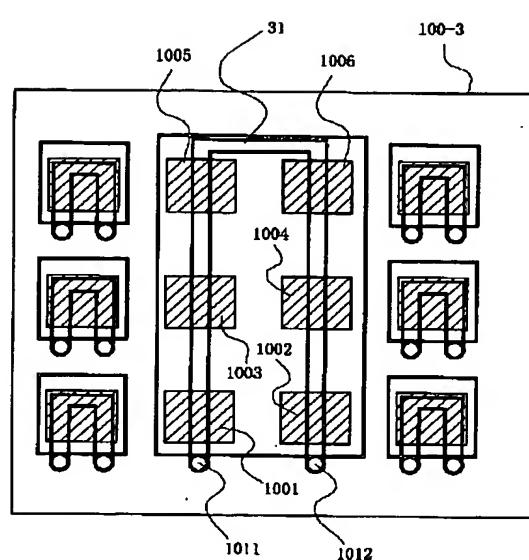
【図 9】

図 9



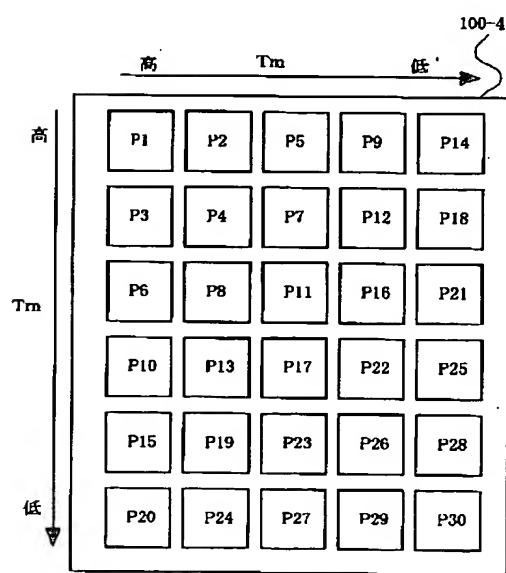
【図 10】

図 10



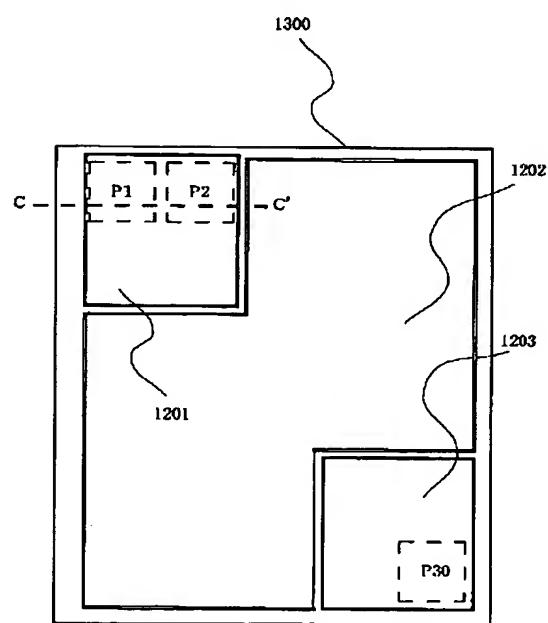
【図 11】

図 11



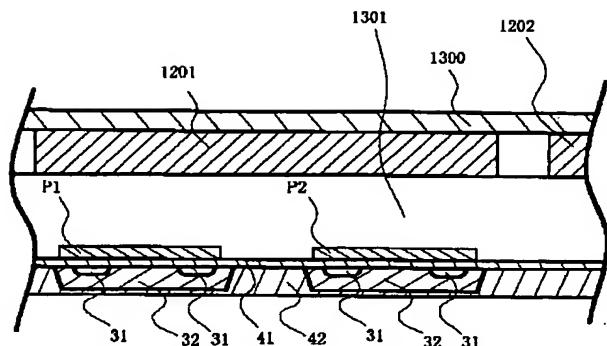
【図 12】

図 12



【図 13】

図13

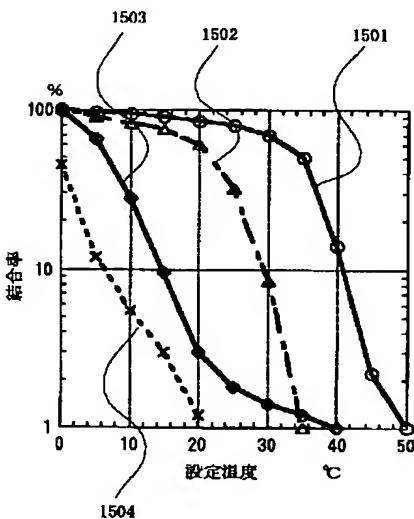
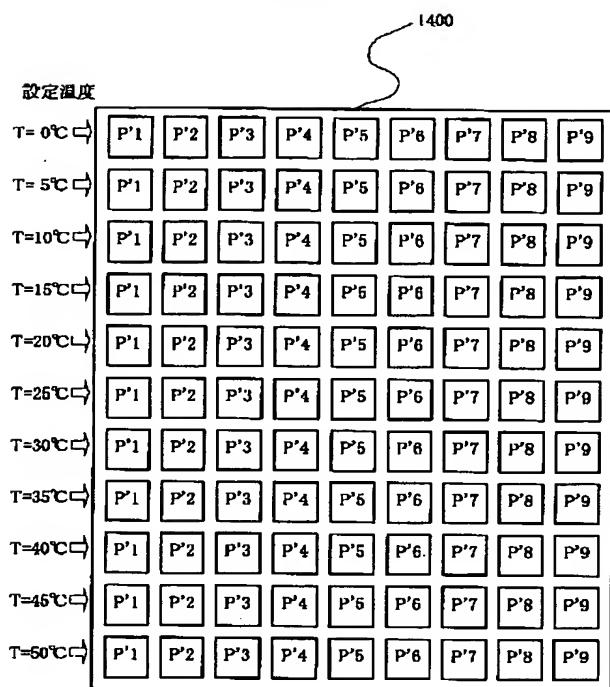


【図 15】

図15

【図 14】

図14



【図 16】

図16

フロントページの続き

(51) Int.C1.⁷

// G 0 1 N 33/543

識別記号

5 9 3

F I

G 0 1 N 33/543

「マークコード」(参考)

5 9 3

(72) 発明者 村川 克二

東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目280番地
株式会社日立製作所中央研究所内

F ターム(参考) 2G045 AA35 DA12 DA13 DA14 FA33
FB02 GC30 HA09
4B024 AA11 AA19 AA20 CA01 CA09
FA18 HA14 HA19
4B029 AA07 AA23 BB20 CC03 CC08
CC11 FA03 FA15
4B063 QA01 QQ43 QQ48 QR32 QR38
QR62 QS03 QS34 QS36 QX02